ÜBER DAS VERHALTEN VON GAL-1-P WÄHREND MEHRSTÜNDIGER GAL-ZUFUHR BEI VERSCHIEDENEN ZUFUHRRATEN MIT HILFE EINER NEUEN ENZYMATISCHEN BESTIMMUNGSMETHODE FÜR GAL-1-P

Sieghart Garbe

München
1970
1971

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546018_0047

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München

Direktor: Professor Dr. W. SEITZ

ÜBER DAS VERHALTEN VON GAL-1-P WÄHREND MEHRSTÜNDIGER GAL-ZUFUHR BEI VERSCHIEDENEN ZUFUHRRATEN MIT HILFE EINER NEUEN ENZYMATISCHEN BESTIMMUNGSMETHODE FÜR GAL-1-P

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin

verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Sieghart Garbe

aus München

1970

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Berichterstatter: Professor Dr. Nepomuk Zöllner

Mitberichterstatter: Professor Dr. W. Seitz

Dekan: Professor Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Februar 1971

Fotodruck · Mikrokopie GmbH, 8 München 22, Bruderstraße 9

Inhalt

Vorbemerkungen 1

Andere Methoden zur Bestimmung von Gal-1-P 3

Eine enzymatische Bestimmungsmethode für Gal-1-P . . 7

Herstellung des Hämolysats 7

Enteiweißen 8

Bestimmung im optischen Test 9

Präzision der Methode 13

Ergänzende Bemerkungen zur Methode 16

Gal-1-P-Konzentrationen in Erythrocyten während mehrstündiger Galaktose-Infusionen bei Gesunden . . 19

Versuchsanordnung 19

Ergebnisse 21

Diagramme 27

Diskussion 40

Zusammenfassung 44

Literaturverzeichnis 45

V O R B E M E R K U N G E N

Galactose wird im gesamten Organismus auf dem sogenannten LELOIR-Weg zu Glucose umgebaut:

I. Gal $\xrightarrow[ATP]{\text{Galactokinase}}$ Gal-1-P;

II. Gal-1-P + UDPG $\xrightarrow{\text{Gal-1-P U T}}$ UDPGal + G-1-P;

III. G-1-P $\xrightarrow[\text{G-1-6-P}]{\text{PGM}}$ G-6-P;

In diesem Galactose-Metabolismus wurden bisher an zwei Stellen Enzymmängel festgestellt, die beide mit Galactosämie einhergehen:

1. Mangel oder Fehlen von Gal-1-PUT
2. Mangel oder Fehlen von Galactokinase.

Wie bekannt ist, werden die Symptome der Galactosämie, wie Erbrechen, Durchfälle, Nahrungsverweigerung, Gelbsucht, Hepatomegalie, schlechte Gewichtszunahme, Albuminurie, Aminoacidurie, später Lebercirrhose, Linsenkatarakte und Rückstand der geistigen Entwicklung, in engen Zusammenhang mit dem Ansteigen des Gal-1-P-Spiegels bzw. des Galaktitols im Organismus gebracht.

Bei Gal-Infusionen, die im Rahmen von Untersuchungen des Stoffwechsels bei parenteral zugeführten Hexosen durchgeführt wurden, zeigten sich vereinzelt Erscheinungen, die denen hereditärer Galactosämie ähnelten.

Es sollte im folgenden nach einer hochspezifischen, präzisen und kurzdauernden Methode gesucht werden, mit der ohne größeren Aufwand an Zeit und Material Serienmessungen durchgeführt werden können, um den Gehalt von Gal-1-P in Erythrozyten festzustellen.

ANDERE METHODEN ZUR BESTIMMUNG VON Gal-1-P

Bei Durchsicht der Literatur fanden wir eine ganze Reihe von Bestimmungsmethoden, die sich aber auf wenige Grundprinzipien zurückführen lassen:

1. Die Mehrzahl der beschriebenen Methoden mißt auf verschiedene Weise die Aktivität der Gal-1-PUT, die bei Galaktosämie aufgehoben oder wenigstens vermindert ist.

2. Das pathologische Substrat, Gal-1-P, wird direkt bestimmt.

zu 1.

a) Am verbreitetsten ist der UDPG-Verbrauchstest. Die Grundlage der verschiedenen Modifikationen dieser Methode entstammt einer Veröffentlichung von ANDERSON, KALCKAR et al., die die nach der Gleichung

$$\text{Gal-1-P} + \text{UDPG} \xrightarrow{\text{Gal-1-PUT}} \text{G-1-P} + \text{UDPGal}$$

verbrauchte Menge UDPG mittels des spezifischen Enzyms UDPG-DH durch die Meßreaktion

$$\text{UDPG} + \text{NAD} \xrightarrow{\text{UDPG-DH}} \text{UDPGA} + \text{NADH} + \text{H}^+$$

photometrisch bestimmen.

Die Methode wurde präzisiert durch KIRKMAN und MAXWELL, die das bei Galaktosämie fehlende Enzym in Form von Hämolysaten gesunder Erythrocyten zugaben, während

ursprünglich der UDPG-Verbrauch einer "incubation-mixture", der Gal-1-P und PP zugegeben wurden, im Vergleich zu der das Hämolysat enthaltenden Lösung bestimmt worden war.

Alle übrigen UDPG-Verbrauchstests (UDPG-consumption-test) basieren auf diesen beiden angegebenen Methoden.

b) Einige Autoren lösen vorhandenes Gal-1-P, hydrolysieren es, fertigen ein Papierchromatogramm an und bestimmen die Gal mittels Chromatogrammen bekannter Konzentrationen oder durch Gal-Oxydase.

c) Auch die Verbrauchsmessung von zugegebenem radioaktiven Gal-1-P ist eigentlich eine Messung der Transferaseaktivität.

d) Die Tatsache, daß bei Anwesenheit von Gal-1-P die O_2-Aufnahme von Erythrocyten vermindert ist, bildet die Basis einiger Methoden, die die Druckabnahme in Erythrocyten enthaltenden geschlossenen Gefäßen messen und daraus auf den Gehalt von Gal-1-P schließen.

e) Einige optische Tests beruhen auf der Reduktion von Methylenblau: In Gegenwart von Gal-1-PUT wird aus Gal-1-P und UDPG ⟶ G-1-P und UDPGal gebildet; durch die Phosphoglucomutase entsteht dann G-6-P, das durch

G-6-PDH in Anwesenheit von NADP oxydiert wird. Dabei wird Methylenblau reduziert.

f) Eine weitere Aktivitätsbestimmung der Transferase ist die von COLOMBO et al. modifizierte Methode von KURAHASHI und ANDERSON (siehe unten) nach den eingangs erwähnten Gleichungen und der photometrischen Meßreaktion

$$G\text{-}6\text{-}P + NADP \xrightarrow{G\text{-}6\text{-}PDH} 6 - PG + NADPH + H^+;$$

zu 2.

a) KURAHASHI und ANDERSON gewannen Gal-1-PUT aus Kalbsleber und bestimmten damit erstmalig vorhandenes Gal-1-P direkt, wobei ebenfalls die Reduktion von NADP durch G-6-PDH und G-6-P als photometrische Meßreaktion diente.

b) GITZELMANN berichtete kürzlich über eine weitere Methode. Hierbei wird Gal-1-P durch alkalische Phosphatase in Gal und Phosphat gespalten; die Gal kann dann direkt enzymatisch gemessen werden. Allerdings ist hierbei eine vorherige Messung der Gal nötig; die zweite Messung gibt dann Aufschluß über den Gehalt an aus Gal-1-P freigesetzter Gal.

Der Vergleich der verschiedenen Methoden zeigt, daß die meisten für unsere Zwecke zu ungenau und aufwendig sind. Wir wollten zudem direkt das für die galaktosämischen Symptome verantwortliche Gal-1-P bestimmen, um exakter die entstehenden Stoffwechselverhältnisse beschreiben zu können. Dazu schien uns der von KURAHASHI und ANDERSON beschriebene Weg am geeignetsten.

EINE ENZYMATISCHE BESTIMMUNGSMETHODE FÜR Gal-1-P

Mit Hilfe der von der Fa. Boehringer, Tutzing, hergestellten Gal-1-PUT gelingt es, im Gegensatz zu allen anderen bisher bekannten Methoden zur spezifischen Diagnose der Galaktosämie, das Substrat selbst, Gal-1-P, direkt zu bestimmen.

Bedingt durch die hohe Substratspezifität der Enzyme des LELOIR-Weges, erhält man eine empfindliche Methode zur Bestimmung dieses Esters, deren Prinzip erstmalig von KURAHASHI und ANDERSON beschrieben wurde:

Meßreaktion: $\text{Gal-1-P} + \text{UDPG} \xrightarrow{\text{Gal-1-PUT}} \text{UDPGal} + \text{G-1-P}$

Hilfsreaktion: $\text{G-1-P} \xrightarrow[\text{G-1-6-P}]{\text{PGM}} \text{G-6-P}$

Indikatorreaktion: $\text{G-6-P} + \text{NADP}^+ \xrightarrow{\text{G-6-PDH}} \text{6-PG} + \text{NADPH} + \text{H}^+$

Die Fa. Boehringer verwendete dieses Prinzip zur Aktivitätsmessung ihrer Gal-1-PUT. Wir modifizierten sie, um den Ester zu bestimmen.

1. Herstellung des Hämolysats

Um Serienmessungen während sechsstündiger Gal-Infusionen vornehmen zu können, wurde eine Braunüle in die Armvene

gelegt, so daß wir ohne Schwierigkeiten zu den beabsichtigten Zeiten genügend Blut entnehmen konnten.
Reagenzgläser wiegen, ca. 5 ml 3,8 %ige Citratlösung (Heparin hemmt Enzyme) hineingeben, ca. 5 ml Venenblut dazupipettieren und zweimal mit je 5 ml physiologischer Kochsalzlösung waschen.
Nach jedem Zentrifugieren - 15 min bei 4000 Upm - Überstand und Leukocyten sorgfältig mit Mikropipette und Wasserstrahlpumpe absaugen.
Die auf diese Weise erhaltenen gepackten Erythrocyten wiegen und ihr Volumen berechnen:

$$\frac{\text{Erythrocytengewicht}}{s} = \text{Erythrocythenvolumen;}$$

$s = 1{,}1$ g/ml;

Zur Hämolyse wird die gleiche Volumenmenge Aqua bidest. hinzugefügt. Nach einer halben Stunde Lagern der mit Parafilm verschlossenen Reagenzgläser im Eisfach erhielten wir ein vollständiges, noch gut pipettierbares Hämolysat.

2. Enteiweißen

Um in einen Absorptionsbereich mit optimaler Ablesegenauigkeit zu kommen, müssen das Hämoglobin und andere vorhandene Proteine aus dem Hämolysat entfernt werden. Nach unseren Erfahrungen ist Gal-1-P gegen alle sauren

Enteiweißungsmittel auch in der Kälte sehr unstabil. Wir enteiweißen deshalb durch Hitzekoagulation bei pH 8,5.

Nacheinander in ein Zentrifugenglas pipettieren:

Glycinpuffer 0,1 M/pH 8,5	5,0 ml
Hämolysat	0,4 ml

Gut mischen. In einem Wasserbad nach Abdichten der Zentrifugengläser mit doppeltem Parafilm bei 90° C für 5 min stehenlassen. Zentrifugieren. Überstand als Probe verwenden, nachdem auf Zimmertemperatur abgekühlt wurde.

3. Bestimmung im optischen Test

Reagentien und Herstellung

Glycinpuffer (0,1 M, pH 8,5)	0,75 g Glycin in ca. 50 ml aqua bidest. lösen. Mit 2 N NaOH auf pH 8,5 einstellen, auf 100 ml mit aqua bidest. auffüllen.
UDPG, als Na-Salz (113 µM/l)	10 mg UDPG-Na in 1 ml aqua bidest. lösen.
G-1-6-P (188 µM/l)	G-1-6-P-Tetracyclohexyl-ammoniumsalz 0,2 mg in 1,0 ml aqua bidest. lösen.

PGM	2 mg in 1,0 ml aqua bidest. lösen.
Gal-1-PUT, aus Kalbsleber lyophilisiert mit 5-facher Menge Saccharose ≙ 1 U/mg (25^{o} C)	5 mg Gal-1-PUT in 1 ml aqua bidest. lösen.
$NADP\text{-}NaH_2$	10 mg NADP in 1,0 ml aqua bidest. lösen.
G-6-PDH	5 mg in 1,0 ml aqua bidest. lösen.

Die angegebenen Reagentien wurden von der Firma Boehringer, Tutzing, freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Haltbarkeit der Lösungen

PGM, G-1-6-P und G-6-PDH sind bei 0 - 4^{o} C monatelang haltbar.

UDPG- und NADP-Lösungen wöchentlich neu ansetzen.

Gal-1-PUT unmittelbar vor jeder Analyse frisch lösen.

Vorgehen

Hämolysat wie beschrieben sofort im Anschluß an die Blutabnahme herstellen. Es ist bei Temperaturen von -20° C mehrere Tage lang haltbar. Jedoch konnten wir bei Analysen von eingewogenen Gal-1-P-Standardlösungen, die bei ca. 4° C 38 Tage aufbewahrt worden waren, eine Hydrolysenrate von täglich 1,78 % feststellen; wir empfehlen daher die sofortige Verarbeitung der Hämolysate.

Nach dem Enteiweißen (s. o.) nacheinander in eine Küvette (Schichtdicke 1 cm) pipettieren:

Probe	2,7 ml
UDPG	0,1 ml
G-1-6-P	0,01 ml
PGM	0,02 ml
Gal-1-PUT	0,15 ml

mischen. Nach 20 min Reaktionszeit E_1 ablesen.

NADP	0,1 ml
G-6-PDH	0,05 ml

Nach 10 min E_2 ablesen.

Gemessen wird bei einer Wellenlänge von 366 nm im Eppendorf-Photometer gegen Luft.

Die Konzentration an Gal-1-P wird nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz berechnet:

$$c = \frac{\Delta E \cdot MG \cdot KV \cdot VF_H}{\varepsilon \cdot d \cdot PV}$$

KV = Küvettenvolumen = 3,13 ml
MG = Molekulargewicht des Gal-1-P = 260
ε = molekulare Extinktion von NADP = $3,3 \cdot 10^6$
PV = Probevolumen = 0,2 ml
d = Schichtdicke der Küvette = 1 cm

Beim Enteiweißen fällt entsprechend dem Eiweißgehalt des Hämolysats ein bestimmtes Volumen als Sediment aus. Der Verdünnungsfaktor (VF_H) des Hämolysats errechnet sich folgendermaßen:

spez. Gewicht der Erythrocyten = 1,100
Wassergehalt der Erythrocyten = 65 %

$VF_H = 1 + 1 \cdot 1,1 \cdot 0,65 = 1,715$

Entsprechend dem Verdünnungsfaktor VF_H enthalten 0,4 ml des verwendeten Hämolysats

$(0,2 + 0,2 \cdot 0,715) = 0,343$ ml Wasser;

Nach Verdünnung mit 5,0 ml Glycinpuffer enthält dieses Gemisch 5,343 ml Wasser; die davon entnommene Menge von

2,7 ml Überstand entspricht einem Probevolumen von

$$0{,}2 \cdot \frac{5{,}4}{5{,}343}\ \text{ml} = 0{,}202\ \text{ml} \triangleq 0{,}2\ \text{ml PV};$$

Es folgt dann:

$$c = \frac{\Delta E \cdot 260 \cdot 1000 \cdot 100 \cdot 3{,}13 \cdot 1{,}715}{3{,}3 \cdot 10^6 \cdot 0{,}2};$$

$$c = \Delta E \cdot 212;$$

4. Präzision der Methode

In den Erythrocyten von Gesunden konnte kein Gal-1-P gefunden werden. Wir waren daher darauf angewiesen, Präzisionsbestimmungen mit eingewogenen Standardlösungen durchzuführen. Zur Verfügung stand das Bi-Kaliumsalz von Gal-1-P mit dem MG von 426,4 : Gal-1-PK_2 . 5 H_2O.

Präzisionsbestimmungen

Eine Standardlösung mit einer Konzentration von 40,7 mg% Gal-1-PK_2 . 5 H_2O wurde eingewogen und 18mal analysiert.

Resultate:

4 x	40,9 mg%
7 x	40,65 mg%
6 x	40,45 mg%
1 x	41,05 mg%
c_m =	40,66 mg%

Standardabweichung: $\pm s = \sqrt{\frac{\sum x^2 - N (\bar{x})^2}{N - 1}}$

x = ermittelte c

$\bar{x} = c_m$

N = Anzahl der Analysen

$s = \pm 0{,}219$ %

Variationskoeffizient: $VK = \frac{100 \cdot s}{\bar{x}} = 0{,}538$ %

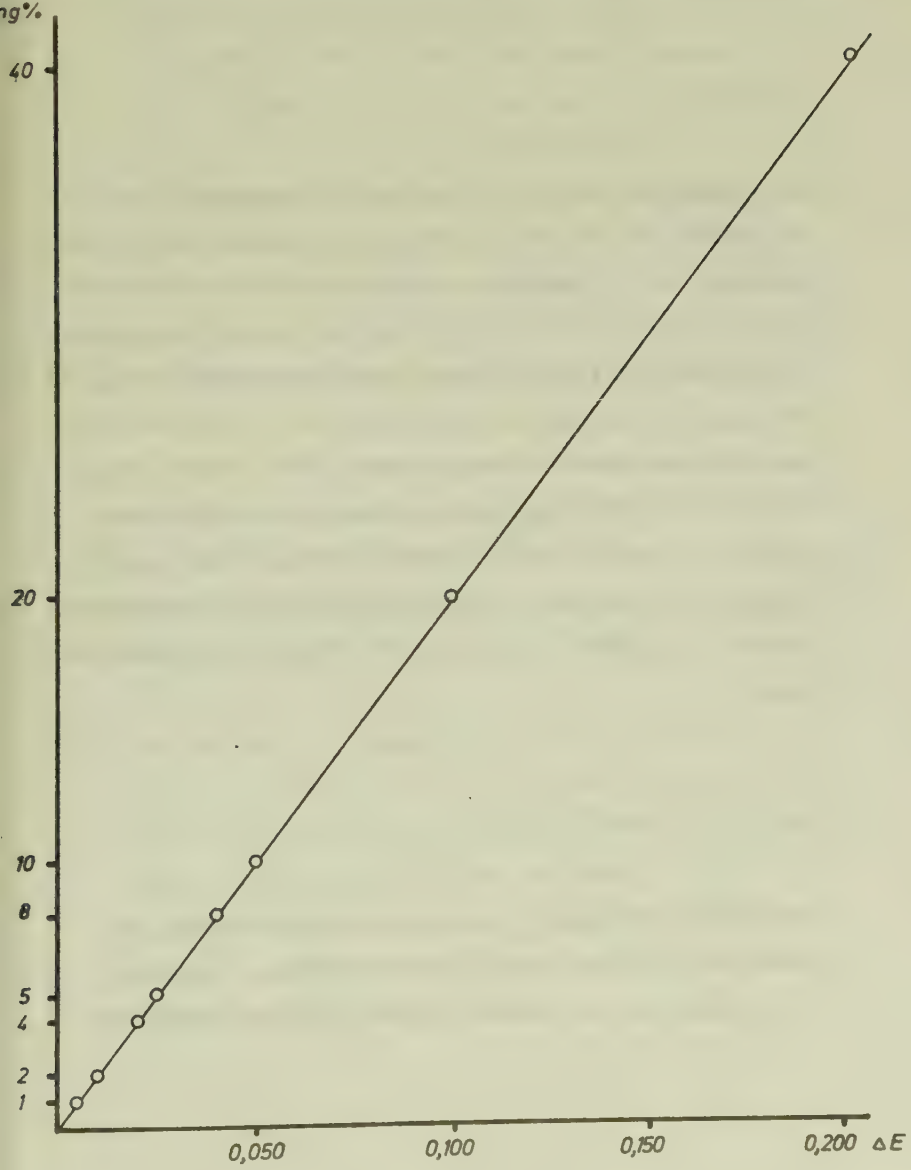
Standardabweichung vom Mittelwert:

$$\sigma_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{N}} = 0{,}0516 \text{ \%}$$

Zur Herstellung einer Eichkurve wurden exakt eingewogene Standardlösungen mit den Konzentrationen 1 mg%, 2 mg%, 4 mg%, 5 mg%, 8 mg%, 10 mg%, 20 mg%, 40 mg% analysiert.

EICHKURVE

ONZENTRATION DER
CHLÖSUNG
ng%



5. Ergänzende Bemerkungen zur Methode

zu H ä m o l y s e

Die Leukocyten werden bei den Waschvorgängen entfernt, da sie instabilere Enzymverhältnisse aufweisen, die die zum Zeitpunkt der Blutabnahme herrschenden Verhältnisse verwischen könnten. Die verbleibenden gepackten Erythrocyten können dann als einheitliches Gewebe aufgefaßt werden, an dem wegen der raschen Diffusion der Gal die Stoffwechselverhältnisse dieser Hexose gut beobachtet werden können. Es ist dafür zu sorgen, daß das Hämolysat sofort hergestellt wird und in das Gefrierfach gestellt oder gleich analysiert werden kann, da die physiologisch vorhandenen Enzyme die zugeführte Gal nach der Blutabnahme weiter umsetzen.

zu E n t e i w e i ß e n

Der Versuch, mit sauren Reagentien zu enteiweißen, ist immer mit Hydrolyse des Gal-1-P verbunden. Organische Fällungsmittel, wie Alkohol, Äther, Aceton, zerstörten

die Häm-Globin-Bindung, so daß das Häm im Überstand in der Lösung blieb und keine Extinktionsablesung im günstigen Bereich ermöglicht. Erst nach Hitzekoagulation in alkalischem Milieu läßt sich ein klarer Überstand gewinnen, in dem nach einer Temperatur von 90° C über eine Dauer von 5 min keine Konzentrationsverminderung mehr festgestellt werden konnte.

zu Bestimmung im o p t i s c h e n T e s t

Die von der Firma Boehringer, Tutzing, gelieferten Reagentien wurden wie angegeben gelöst oder als fertige Suspension verwendet. Bei der Wahl der eingesetzten Volumina und Reagentien zeigten sich folgende Besonderheiten:

Das zur Analyse eingesetzte Hämolysatvolumen soll 0,2 ml nicht überschreiten, da sonst die zugegebenen Enzyme im Küvettenvolumen relativ zu gering konzentriert sind, so daß das Ende der Reaktionen nach den Gleichungen I und II zu lange hinausgeschoben wird. Eine Extinctionsänderung nach den ermittelten Reaktionszeiten war nicht zu beobachten.

Gelöste Uridyltransferase verliert pro Tag so viel an Aktivität, daß das Analysenergebnis für gleiche Eichkonzentrationen nach einem Tag um 5,1 % vermindert ist.

Mg^{++}-Ionen hemmen Gal-1-PUT.

Sowohl PGM als auch G-1-6-P_2 hemmen wahrscheinlich Gal-1-PUT. Gibt man jedoch weniger als die angegebenen Enzymmengen, so scheinen sie ihrerseits durch Gal-1-P gehemmt zu werden.

zu P r ä z i s i o n der Methode

Zur Präzisionsbestimmung wählten wir eine Eichkonzentration von 40 mg% Gal-1-P, da dies nach SCHWARZ et al. die höchste bei galaktosämischen Patienten gefundene Konzentration in den Erythrocyten sein soll.

Die verwendete Standardlösung wurde vor der Analyse Verhältnissen ausgesetzt, wie sie der Hitzekoagulation entsprechen.

Die Pufferlösung muß vor jeder Analyse einer pH-Kontrolle unterzogen werden. pH-Werte außerhalb des pH-Optimums für Gal-1-PUT - pH 8,5 - führen zu ungenauen Ergebnissen.

GAL-1-P-KONZENTRATIONEN IN ERYTHROCYTEN WÄHREND MEHRSTÜNDIGER GALAKTOSE-INFUSIONEN BEI GESUNDEN

Nachdem Standardlösungen mit verschiedenen Mengen eingewogenen Gal-1-PK_2.5 H_2O exakt bestimmt werden konnten, wurden während sechsstündiger Galaktose-Infusionen, die im Rahmen der Erforschung des Stoffwechsels bei parenteraler Ernährung angelegt wurden, Gal-1-P-Analysen mit der beschriebenen Methode durchgeführt, um ihre Gebrauchsfähigkeit zu prüfen.

V e r s u c h s a n o r d n u n g

Als Versuchspersonen stellten sich stoffwechsel- und kreislaufgesunde Männer im Alter von 25 bis 28 Jahren zur Verfügung. Die Infusionslösung, eine 10 %ige sterile, pyrogen- und elektrolytfreie Galaktoselösung, wurde über eine Infusionspumpe der Firma Harvard Med. Comp., Dover, Mass. USA nach vorangegangener Eichung in den rechten Unterarm injiziert. Das Schlauchsystem und die beiden Luer-Lok-Spritzen der Pumpe waren vor jeder Infusion zu sterilisieren.

Wir legten seens Infusionen, wobei die infundierte Menge in Relation zu Körpergewicht und Zeiteinheit stand: 2 x 0,3 g/kg/h, 2 x 0,5 g/kg/h und 2 x 0,75 g/kg/h.

Die Blutabnahme erfolgte aus einer Vene des linken Unterarms mittels Braunüle zu Beginn des Versuchs als Nüchternwert, nach 75, 135, 195, 255, 315, 360 min und 30 min nach Infusionsende. Aus den abgenommenen Blutproben wurde sofort das Hämolysat hergestellt, in ein Gefrierfach gegeben und nach Beendigung des Versuchs am gleichen Tage aufgearbeitet.

Außerdem wurde alle 30 min Urin gesammelt.

Wir bestimmten neben der Gal-1-P-Konzentration in Erythrocyten auch die Gal-Konzentrationen in Serum und Urin. In einem Fall gelang es, die Gal-Konzentration in Erythrocyten zu bestimmen.

Ergebnisse

In der Zusammenschau der ermittelten Gal-1-P-Konzentrationen kristallisiert sich eine grundsätzliche Aussage heraus:
Sobald eine gewisse Zufuhrrate für Gal überschritten wird, steigt der Gal-1-P-Spiegel nach einer bei allen Versuchspersonen ungefähr gleichen Latenzzeit an, um - wieder nach etwa gleichlangen Zeiten - sich auf ein Konzentrationsplateau einzustellen, das nach Infusionsende sofort steil abfällt. Dabei fällt auf, daß die erreichten Gal-1-P-Konzentrationen selbst bei Zufuhrraten von 0,75 g/kg/h unter 2 mg% bleiben.

Im Vergleich zu den wenigen Infusionszwischenfällen bei früheren Gal-Infusionen, die als galaktosämische Erscheinungen gedeutet wurden, zeigen sich gleichlange Zeiten nach Infusionsbeginn bis zum Auftreten der galaktosämischen Symptome bzw. bis zum Anstieg des Gal-1-P_{Ery}.
Die hier durchgeführten Infusionen verliefen jedoch komplikationslos, so daß sich der geschilderte Zusammenhang nicht eindeutig ergibt; insbesondere fehlen Normwerte über Gal-1-P_{Ery} bei Gal-Belastung.

Fallbeschreibungen

Tabelle 1 stellt die individuellen Infusionsverhältnisse dar:

Infusion	KG	Zufuhrrate in g/kg/h	infundierte Menge in ml	Urinmenge in ml	% Diurese bezogen auf Infus. Vol.
A	90	0,3	1650	2260	37
B	67	0,3	1206	473	keine Diurese
C	71	0,5	2140	2845	33
D	75	0,5	2250	3550	58
E	64	0,75	2800	3675	32
F	74	0,75	3270	3910	20

Tabelle 1

Die folgenden Tabellen 2, 3, 4 geben gefundene Werte wieder:

min	Infusionen A	B	C	D	E	F
0	0	0	0,1	0	0,1	0
75	0	0	0,53	0	0,1	0,1
135	0	0	0,75	0,21	0,1	0,85
195	0,21	0,31	0,85	0,53	0,53	0,85
255	0	0,53	0,85	0,75	1,65	1,27
315	0	0,1	0,95	1,06	1,7	1,27
360	0	0,1	1,38	1,06	1,85	1,27
390	0	0	0,64	0	0,1	0,31

Tabelle 2: mg % Gal-1-P_{Ery}

min	Infusionen					
	A	B	C	D	E	F
0	0	0	0	0	0	0
15	17	5	36,7	32,8	52,2	2,9
45	26	15	100,2	68,5	109	49,5
75	0	19	102,2	93	122	106
105	24	26	130	120	184,5	169
135	27	26	137	150	206	205
165	25	37	163	170,5	237	277
195	33	26	182	180	288,5	288
225	35	22	198,5	198	274	344
255	35	21	204,2	206	328	400
285	39	21	224	227	342	433
315	34	26	225	210	373	444
345	39	30	222	230	422	475
360	38	26	221	235	420	450
390	14	12	194,5	114	262	299

Tabelle 3: mg % Gal_{Serum}

min	Infusionen					
	A	B	C	D	E	F
0	100	-	-	30	55	175
30	-	13	95	50	35	45
60	95	20	60	300	115	175
90	210	12	140	425	295	440
120	235	12	250	350	380	290
150	90	12	380	280	350	360
180	315	11	300	280	300	355
210	290	12	305	345	350	330
240	230	42	270	280	400	385
270	165	116	250	310	280	470
300	140	22	245	215	265	370
330	230	31	295	275	260	345
360	140	115	190	295	390	345
390	120	55	65	115	200	-
Gesamt-menge	2260	473	2845	3550	3675	3910

Tabelle 4: ml ausgeschiedenen Urins

min	Infusionen				
	A	B	C	D	E
0					
30		152	385	870	1550
60	136	98,5	1144	543	1295
90	186	50	1387	560	625
120	154	94	1079	824	778
150	300	87,5	878	1180	1023
180	127	266	1270	1350	1340
210	136	165	1250	1485	1250
240	131	154	1460	1740	1340
270	186	113	1758	1540	1964
300	250	190	1858	1865	1984
330	236	254	1784	2120	1840
360	340	225	2790	2380	1760
390	145		3048	3300	1777

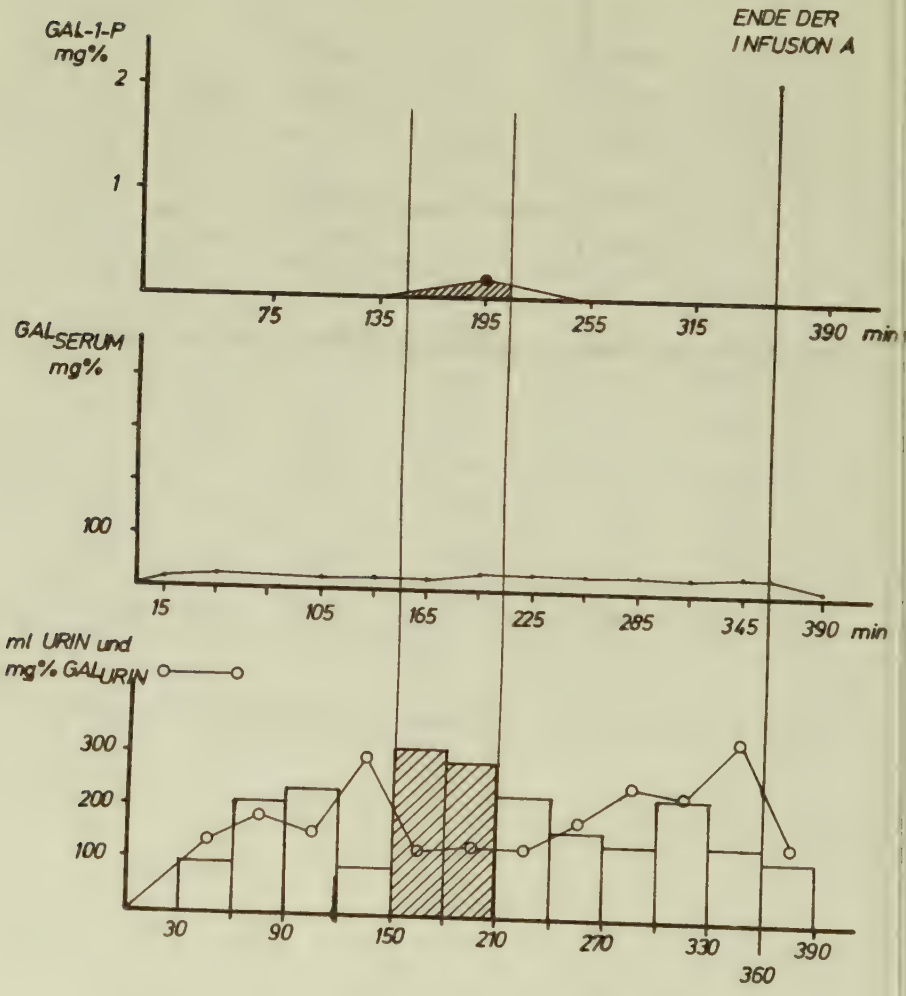
Tabelle 5: Gal-Konzentrationen im ausgeschiedenen Urin

min	c_{gal}
0	0
135	1,34
195	2,24
255	4,47
315	5,14
390	4,92

Tabelle 6: Gal-Konzentrationen im Erythrocyten bei Infusion D

Diagramme sollen im folgenden die gefundenen Werte veranschaulichen:

DIAGRAMM 1



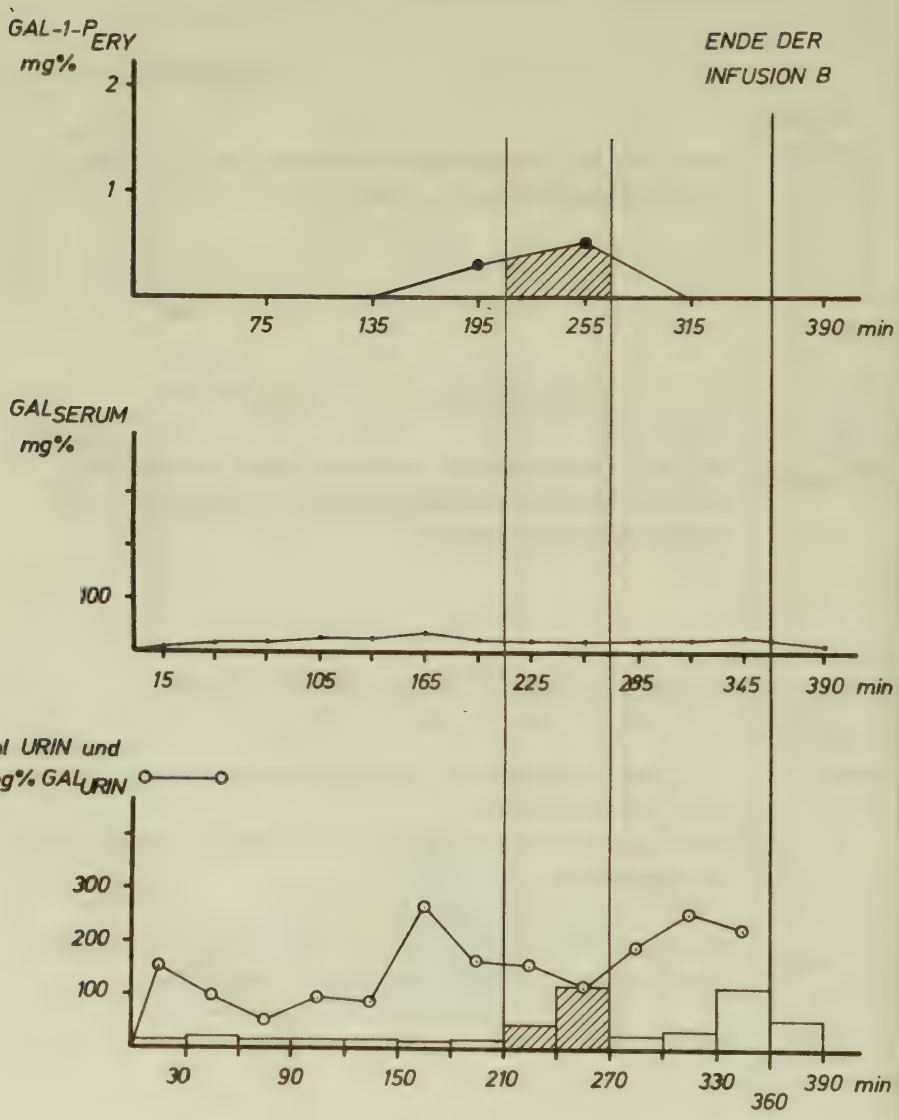
Gal-1-P: nach 195 min geringfügiger Anstieg auf 0,21 mg%, anschließend wieder Null-Werte.

Gal_{Serum}: Die Gal-Konzentration im Serum bleibt während der Infusionsdauer etwa gleich hoch: Gleichgewicht von Zufuhr und Abtransport.

Urin: 37 % der infundierten Flüssigkeitsmenge werden zusätzlich ausgeschieden.
Gesteigerte Urinausscheidung bei Anstieg der Gal-1-P-Konzentration.

Gal_{Urin}: Die Gal-Konzentration im Urin ist der jeweils ausgeschiedenen Urinmenge umgekehrt proportional.

DIAGRAMM 2


GAL-1-P ERY
mg%
2
1
ENDE DER
INFUSION B
75
135
195
255
315
390 min
GAL SERUM
mg%
100
15
105
165
225
285
345
390 min
ml URIN und
mg% GAL URIN
300
200
100
30
90
150
210
270
330
360
390 min

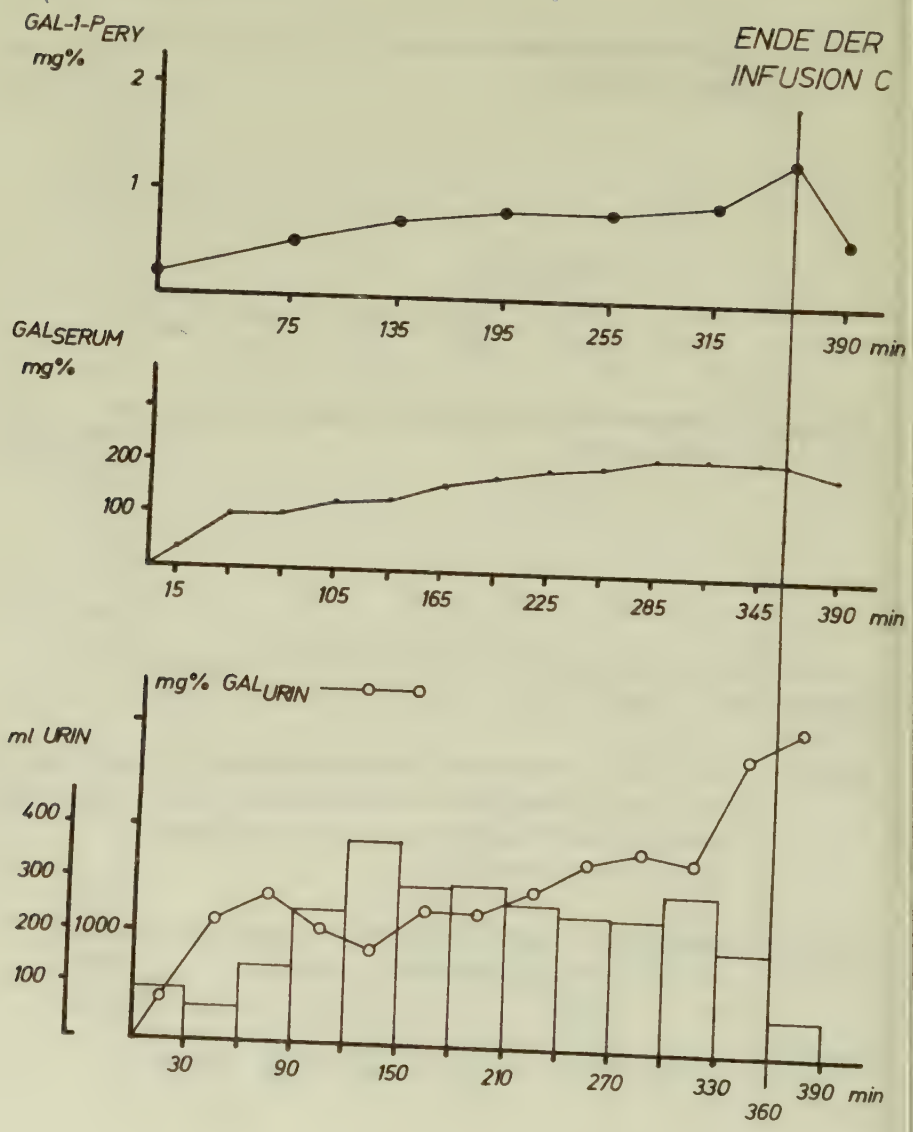
Gal-1-P: Konzentrationsmaximum nach 255 min, dann Abfall auf Null-Werte.

Gal_{Serum}: Gleichgewichtseinstellung zwischen Zufuhr und Abtransport.

Urin: 60 % der infundierten Flüssigkeitsmenge verbleiben in diesem Einzelfall im Organismus.
Anstieg der Urinausscheidung bei Erhöhung der Gal-1-P-Konzentration.

Gal_{Urin}: Umgekehrte Proportionalität von Gal-Konzentration im Urin und dazugehörender Urinmenge.

DIAGRAMM 3


GAL-1-P ERY
mg%
2
1
ENDE DER
INFUSION C
75
135
195
255
315
390 min
GAL SERUM
mg%
200
100
15
105
165
225
285
345
390 min
mg% GAL URIN
ml URIN
400
300
200
100
1000
30
90
150
210
270
330
360
390 min

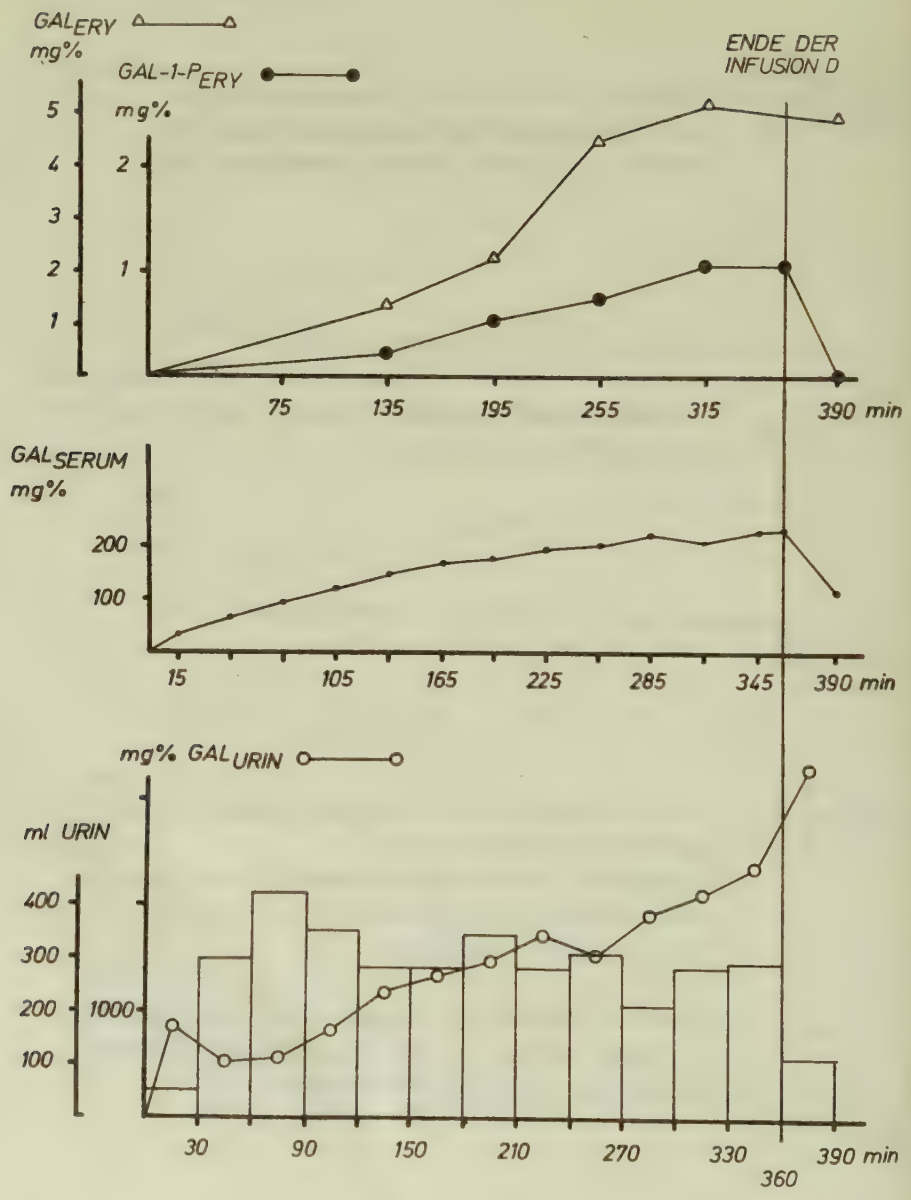
Gal-1-P: Atypischer Verlauf der Konzentrationskurve durch verzögerte Hämolysatherstellung. Die letzten 4 - 5 Werte dürften verwertbar sein.

Gal_{Serum}: Gleichgewichtseinstellung zwischen Zufuhr und Abtransport nach 285 min.

Urin: 33 % der infundierten Flüssigkeitsmenge werden zusätzlich ausgeschieden.
Es ist kein eindeutiger Zusammenhang zwischen gesteigerter Diurese und Erhöhung der Gal-1-P-Konzentration zu erkennen.

Gal_{Urin}: annähernd umgekehrt proportionales Verhalten der Gal-Konzentration zu der dazugehörenden Urinmenge.

DIAGRAMM 4


GAL ERY
mg%
GAL-1-P ERY
mg%
ENDE DER INFUSION D
5
4
3
2
1
2
1
75
135
195
255
315
390 min
GAL SERUM
mg%
200
100
15
105
165
225
285
345
390 min
mg% GAL URIN
ml URIN
400
300
200
100
1000
30
90
150
210
270
330
360
390 min

Gal_{Ery}: Zuerst annähernd linearer, dann steiler Konzentrationsanstieg, schließlich Abflachung in angedeutete Plateaubildung.

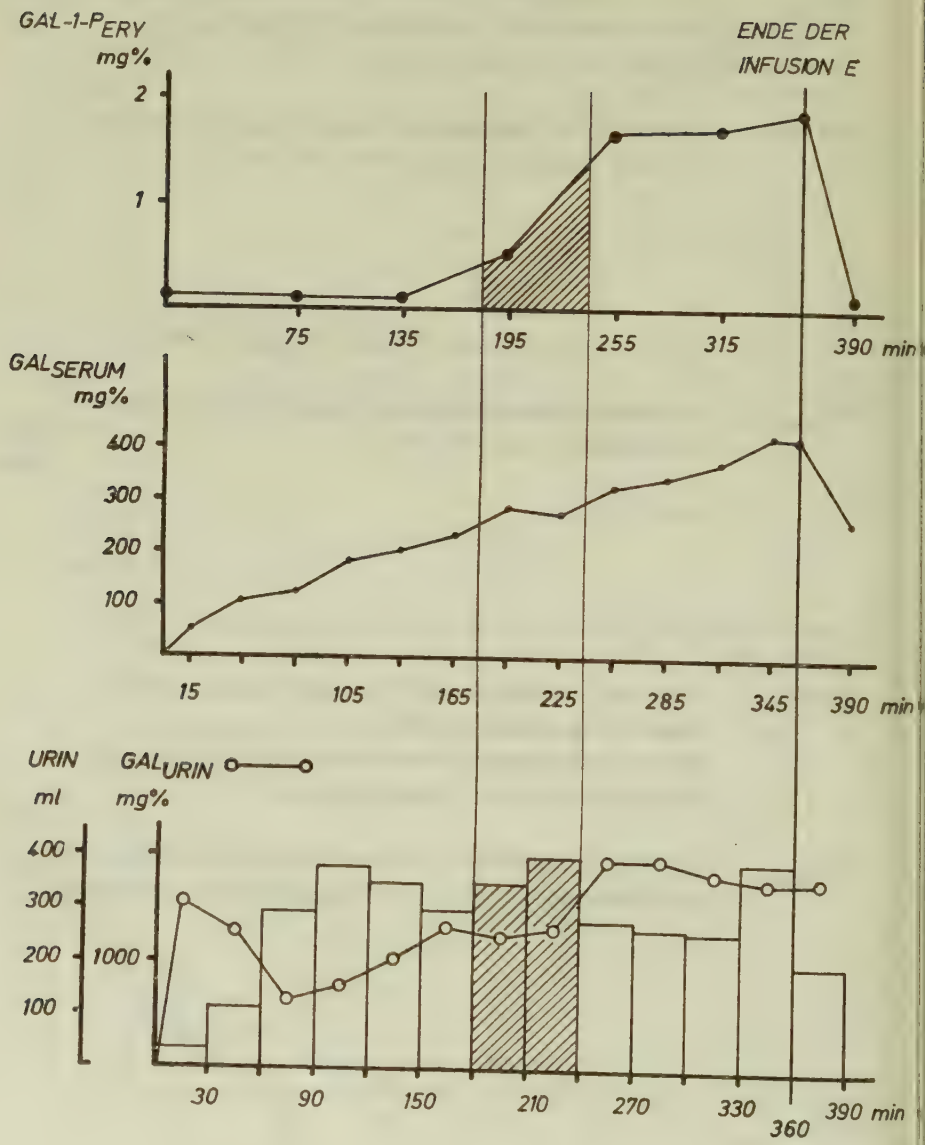
Gal-1-P: Allmählicher Konzentrationsanstieg nach 135 min bis zur Plateaubildung nach 315 min.

Gal_{Serum}: Gleichgewichtseinstellung zwischen Zufuhr und Abtransport nach 285 min.

Urin: 58 % der infundierten Flüssigkeitsmenge werden zusätzlich ausgeschieden.
Keine nennenswerte Zunahme der Diurese bei Anstieg der Gal-1-P-Konzentration.

Gal_{Urin}: annähernd umgekehrt proportionales Verhalten der Gal-Konzentration zu der dazugehörenden Urinmenge.

DIAGRAMM 5


GAL-1-P ERY
mg%
2
1
ENDE DER
INFUSION E
75
135
195
255
315
390 min
GAL SERUM
mg%
400
300
200
100
15
105
165
225
285
345
390 min
URIN
ml
GAL URIN
mg%
400
300
200
100
1000
30
90
150
210
270
330
360
390 min

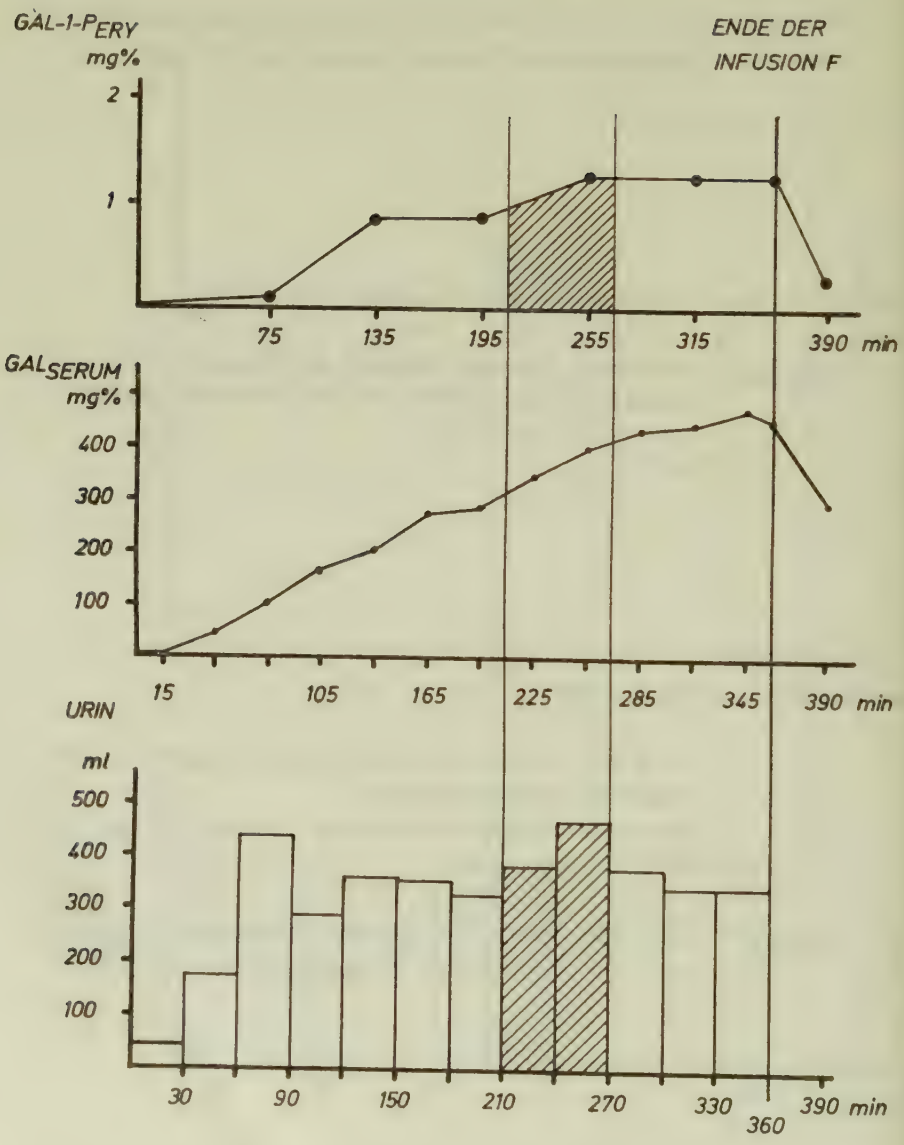
Gal-1-P: Nach 135 min steiler werdender Konzentrationsanstieg bis zur Plateaubildung nach 255 min.

Gal_{Serum}: Annähernd linearer Verlauf der Konzentrationskurve bis zum Maximum von 422 mg% nach 345 min.

Urin: 32 % der infundierten Flüssigkeitsmenge werden zusätzlich ausgeschieden.
Gesteigerte Urinausscheidung bei Anstieg der Gal-1-P-Konzentration.

Gal_{Urin}: Auch hier steht die Gal-Konzentration zur dazugehörenden Urinmenge in umgekehrtem Verhältnis.

DIAGRAMM 6


GAL-1-P ERY
mg%
2
1
ENDE DER
INFUSION F
75
135
195
255
315
390 min
GAL SERUM
mg%
400
300
200
100
15
105
165
225
285
345
390 min
URIN
ml
500
400
300
200
100
30
90
150
210
270
330
360
390 min

Gal-1-P: Konzentrationsanstieg bis zur Plateaubildung nach 255 min.

Gal_{Serum}: Annähernd linearer Verlauf der Konzentrationskurve bis zum Maximum von 475 mg% nach 345 min.

Urin: 20 % der infundierten Flüssigkeitsmenge werden zusätzlich ausgeschieden.
Gesteigerte Urinausscheidung bei Anstieg der Gal-1-P-Konzentration.

Diskussion

Wir können aufgrund der wenigen hier beschriebenen Infusionen, bei denen in erster Linie die praktische Handhabung einer Methode zur Gal-1-P-Bestimmung getestet werden sollte, keine umfassende Aussage über die Verhältnisse der Gal-1-P-Konzentrationen während mehrstündiger Gal-Infusionen bei Gesunden machen. Dennoch zeichnen sich einige typische Besonderheiten ab:

Grundsätzlich scheint sich die Konzentrationskurve für Gal-1-P bei Gal-Infusionen so zu verhalten, daß sie 75 bis 135 min nach Infusionsbeginn ansteigt, nach 255 min ihr Maximum erreicht und von da ab ein Plateau bildet, auf das sich bei 360 min in Einzelfällen noch eine Spitze aufsetzt. Nach Infusionsende fällt die Gal-1-P-Konzentration steil ab, soweit sie nicht schon vorher Nullwerte erreicht hat. So bei einer Zufuhrrate von 0,3 g/kg/h, wo nach 195 bzw. 255 min lediglich ein leichter Anstieg zu bemerken ist, nach weiteren 60 min jedoch wieder Normalwerte zu verzeichnen sind.
Die Gal-Konzentration im Serum verändert sich in dieser Zeit nur geringfügig, wodurch ein Gleichgewicht zwischen

Galaktosezufuhr und -umsatz ausgedrückt ist (siehe Diagramme 1 und 2). Bei einer Zufuhrrate von 0,5 g/kg/h ist der typische Verlauf der Konzentrationsänderung bereits zu erkennen (Infusion D - Diagramm 4; bei Infusion C - Diagramm 3 - sind wegen später Hämolysatherstellung nur die letzten vier Werte verwertbar), und bei einer Zufuhrrate von 0,75 g/kg/h findet sich ab 255 min nach Infusionsbeginn ein eindeutiges Plateau (Diagramme 5 und 6).

Die Aktivität der im LELOIR-Weg vorhandenen Enzyme scheint in den ersten 75 bis 135 min auszureichen, die im Erythrocyten angebotene Menge Gal umzubauen (Bei Infusion D gelang es, die im Erythrocyten vorhandene Gal zu bestimmen.). Nach Verbrauch der vorhandenen Enzyme kommt es bei weiterem Gal-Angebot zu steilem Anstieg der Gal-1-P-Konzentration, sowie der von Gal_{Ery}, bis neu gebildete Enzyme das Gal-Angebot beherrschen. Das Maximum der Enzymaktivität scheint dabei nach 255 min erreicht zu sein.

Allerdings wird in der Literatur beschrieben, daß bei hohen Gal-Konzentrationen die Reaktionsgeschwindigkeit nach der Gleichung Gal + ATP $\longrightarrow$ Gal-1-P + ADP wieder

abnimmt, so daß die diese Reaktion katalysierende Galaktokinase ein ausgesprochenes Konzentrationsoptimum hat.

Nach Art der Variation der Flüssigkeitsausscheidung durch die Nieren scheint ein Zusammenhang zu bestehen zwischen dem ausgeschiedenen Flüssigkeitsvorlumen und den Veränderungen der Gal-1-P-Konzentrationen in der Weise, daß eine Konzentrationszunahme des Gal-1-P einhergeht mit einer Zunahme der Urinausscheidung, so daß es zu Beginn der Infusion eine osmotische Diurese gäbe, während des weiteren Verlaufes aber zusätzlich noch eine stoffwechselbedingte. Dabei fällt auf, daß die Gal-Konzentration im Urin eher noch abnimmt, so daß an eine Hemmung der tubulären Wasserrückresorption durch Gal-1-P bei noch ungeklärtem Mechanismus zu denken wäre.

In der Literatur wird lediglich die vermehrte Ausscheidung von Aminosäuren, Peptiden und Mineralien ohne Konzentrationsänderung im Serum als Ausdruck einer Störung der tubulären Nierenfunktion beschrieben.

Weiteren Untersuchungen - insbesondere auch Tierversuchen - bleibt es vorbehalten, der Rolle des Gal-1-P auch in diesem Zusammenhang nachzuspüren.

Eine größere Infusionsreihe an Gesunden und an Patienten müßte zeigen, ob mit der Bestimmung von Gal-1-P eine präzisere Aussage über die Stoffwechselleistung des Organismus gemacht werden kann als durch die Ermittlung der Gal-Werte.

Zusammenfassung

Nach einer kurzen Übersicht über die Prinzipien bisher bekannter Methoden zur Gal-1-P-Bestimmung wird eine hochspezifische, präzise und relativ kurzdauernde Methode zur Bestimmung dieses Esters vorgestellt, die durch die Herstellung der Gal-1-PUT ermöglicht wurde.

Gal-1-P-Bestimmungen im Hämolysat bei einigen Gal-Infusionen mit verschiedener Zufuhrrate zeigen die Brauchbarkeit der Methode. Aufgrund der relativ übereinstimmenden Untersuchungsergebnisse wird der Versuch einer Aussage gemacht, mit Hinweisen auf Ziele weiterer Untersuchungen bei Gal-Infusionen.

Literaturverzeichnis

Leloir-Weg:

Leloir, L. F.:
The Metabolism of hexose phosphates.
In: Phosphorus Metabolism, vol. 1, p. 67, Edited by McElroy, W. D. and Glass, B.
Baltimore, 1951, John Hopkins Press

Leloir, L. F.:
Enzymatic transformation of uridine diphosphate glucose into galactose derivative.
Arch. Biochem., 33: 186, 1951

Kalckar, H. M, Braganca, B. and Munch-Petersen, A.:
Uridyl transferases and the formation of uridine diphosphate galactose.
Nature, London, 172: 1038, 1953.

Kalckar, H. M.:
Biochemical mutations in man and micro-organisms.
Science, 125: 105, 1957.

Ubiquitäres Vorkommen der Leloir-Fermente:

Fischer, W. und Weinland, H.:
Stoffwechsel der Gal und ihrer Derivate.
ed. G. Weitzel und N. Zöllner, Georg-Thieme-Verlag
Stuttgart 1965, p. 72 Tab. 38

Enzymmängel im Leloir-Weg:

Gal-1-PUT-Mangel und erhöhter Gal-1-P-Spiegel:

Schwarz, V.:
Metabolic disturbances in galactosämie.
Mod. Probleme der Pädiatrie, vol. IV, p. 402,
S. Karger, Basel - New York 1959

Kurt, J., Isselbacher, M. D.:
Galactose Metabolism and Galactosemia.
American Journal of Medicine, 5, 1959, p. 715

Gitzelmann, R.:
Der Galaktosestoffwechsel und seine Störungen.
Pädiat. Fortbildungskurse 19, 93 (1967)

Schwarz, V., Goldberg, L., Komrower, G. M. and Holzel, A.:
Metabolic observations on the Erythrocytes from cases
of galactosemia.
Biochem. J., 59: 22, 1955.

Isselbacher, K. J., Anderson, E. P., Kurahashi, K.
and Kalckar, H. M.:
Congenital galactosemia, a single enzymatic block in
galactose metabolism.
Science, 123: 635, 1956

Kalckar, H. M., Anderson, E. P. and Isselbacher, K. J.:
Galactosemia, a congenital defect in a nucleotid
transferase.
Biochem. et Biophys. acta, 20: 267, 1956

Holzel, A., Komrower, G. M. and Schwarz, V.:
Galactosemia.
Am. J. Med. 22: 703, 1957

Ginsburg, V. and Neufeld, E. F.:
The inhibition of phosphoglucomutase by galactose-1-phosphate: a possible factor in galactose toxicity.
Abstr., Meeting of Am. Chem. Soc., Sept. 1957

Sidbury, J. B. Jr.:
The enzymatic lesions in galactosemia.
J. Clin. Invest., 36: 929, 1957.

Isselbacher, K. J.:
Galactosemia.
In "The Metabolic Basis of Inherited Disease", edited by J. B. Stanbury, J. B. Wyngaarden and D. S. Fredrickson. McGraw-Hill, New York, 1960, p. 208

Galactokinasemangel:

Gitzelmann, R.:
Deficiency of erythrocyte galactokinase in a Patient with Gal-diabetes.
Lancet 1965 II, 670.

Methoden zur Bestimmung von Gal-1-P:

1. a) UDPG-Verbrauchstest

Anderson, E. P., Kalckar, H. M., Kurahashi, K. and Isselbacher, K. J.:
A specific enzymatic assay for the diagnosis of congenital galactosemia.
J. Lab. & Clin. Med. 50, 1957, p. 469

Kirkman, H. N. and Maxwell, E. S.:
Enzymatic estimation of erythrocytic gal-1-p.
J. Lab. & Clin. Med. 56, 1960, p. 161

Bretthauer, R. K., Hansen, R. G., Donnel, G. and Bergren, W. R.:
A procedure for detecting carriers of galactosemia.
Proc. Nat. Acad. Sc. 45: 328, 1959

Beutler, E. and Baluda, M. C.:
Improved Method for measuring gal-1-PUT-aktivity of erythrocytes.
Clin. Chim. Acta (Amsterdam) 13, 369, 1966

Donnel, G., Bergren, W. R., Grace Perry and Koch, R.:
Gal-1-P in galactosemia.
Pediatrics, 31, 1963, p. 802

Mellmann, W. J. and Tedesco, T. A.:
An improved assay of erythrocyte and leucocyte gal-1-PUT.
J. Lab. Clin. Med. 66, 980, 1965

b) Papierchromatographie

Schwarz, V., Goldberg, L., Komrower, G. M. and Holzel, A.:
Some disturbances of erythrocytes metabolisme in galactosemia.
Biochem. J. 62, 34-40, 1956

Penton, J. C. B.:
The estimation of gal-1-p in red cells.
Clin. Chim. Acta (Amsterdam) 11, 205, 1965

Carney, S. A., Lawrence, J. C. and Rickets, C. R.:
Biochem. J. 83, 533, 1962

c) Radioaktives Gal-1-P

Gin Won NG, Bergren, W. R. and Donnel, G. N.:
Gal-1-PUT assay by use of radioaktive gal-1-P.
Clin. Chim. Acta (Amsterdam) 10, 337 (1964)

d) Verminderte O_2-Aufnahme

Schwarz, V., Holzel, A. and Komrower, G. M.:
Laboratory diagnosis of congenital galactosemia at birth.
Lancet 1, 24, 1958

Kirkman, H. M. and Bynum, E.:
Encymic evidence of a galactosemic trait in parents of galactosemic children.
Ann. Human. Genet. 23: 117, 1959

Hsia, D. Y., Tannenbaum, M., Schneider, J. A., Huang, I. and Simpson, K.:
Further studies on the heterozygous carrier in galactosemia.
J. Lab. & Clin. Med. 56, 368, 1960

Schwarz, V. and Simpson, I. M. N.:
in: Galactosemia.
Hsia, D. Y. - Y. ed., Thomas, Charles C.,
Springfield III, in the press

e) Reduktion von Methylenblau

Beutler, E. et al.:
A new screening procedure for the detection of galactosemia.
J. Clin. Invest. 43, Nr. 6, 1964, p. 1302

f) Bestimmung der Gal-1-PUT

Colombo, J. P., Moser, H., Rosin, S., Richterich, R. and Rossi, E.:
Bestimmung der Gal-1-PUT bei der Galaktosämie.
Klinische Wochenschrift 20, 1965, p. 1074

2. Direkte Bestimmung von Gal-1-P

Kurahashi, K. and Anderson, E. P.:
Gal-1-PUT, its purification and application.
Biochem. et Biophys. acta, 29, 1958, p. 498

Gitzelmann, R.:
Laboratory for Metabolic Research,
University Pediatric Department, Kinderspital,
8032 Zürich, Switzerland
Estimation of gal-1-P in erythrocytes: A rapid
and simple method.

Substratspezifität der Enzyme des Leloir-Weges:

Rutter, W. J. and Hansen, R. G.:
J. biol. Chemistry 202, 323 (1953)

Kirckmann, H. N. and Bynum, E.:
Ann. Human Genetics (London) 23, 117 (1959)

Együd, L. G. and Whelan, W. J.:
Biochem. J. 86, 11 P (1963)

Haltbarkeit der Lösungen:

Angaben der Firma Boehringer, Mannheim.

Kein endogener Gal-Blutspiegel:

Montreuil, J. und Boulanger, P.:
C. R. hebd. Séances acad. Sci.
236 (1953), 337.

White, A. A., Hess, W. C.:
Arch. Biochem. Biophysics
64 (1956), 57.

Date, J. W.:
Scand. J. clin. Lab. Invest. 10 (1958), 155.

Bickel, H. in Linneweh, F.:
Die physiologische Entwicklung des Kindes.
Springer, Berlin 1959, S. 240.

Leukocyten:

Mellmann, W. J. and Tedesco, T. A.:
An improved assay of erytrocyte and leukocyte gal-1-PUT.
J. Lab. Clin. Med. 66, 980, 1965.

Schneller Konzentrationsausgleich am Erytrocyten:

Le Fevre, P. G., Davies, R. I.:
J. gen. Physiol. 34 (1951), 515.

Hemmung der PGM durch Gal-1-P:

Klenow, H., Emberland, R.:
Arch. Biochem. Biophysics. 58 (1955), 276.

Sidbury, J. B.:
Amer. chem. Soc. Abstracts of Papers, 132nd Meeting
Sept. 8.-13. 1957 p. 27 C.

Sidbury, J. B.:
J. clin. Invest. 36 (1957), 929.

Ginsburg, V., Neufeld, E. F.:
Amer. chem. Soc. Abstracts of Papers, 132nd Meeting
Sept. 8.-13. 1957 p. 27 C.

Najjar, V. A., McCoy, E. E.:
Moderne Probleme der Pädiatrie
Band 4, S. 109, S. Karger Verlag, Basel-New York 1959.

Hemmung der Gal-1-PUT durch Mg^{++}:

Kurahashi, K., Sugimura, A.:
J. biol. Chemistry 235 (1960), 940

Höchste Konzentration von Gal-1-P im Erythrocyten:

Schwarz, V.:
Moderne Probleme der Pädiatrie
Band 4, S. 402, S. Karger Verlag, Basel-New York 1959.

Holzel, A. in Linneweh, F.:
Erbliche Stoffwechselkrankheiten
Urban und Schwarzenberg, München-Berlin, 1962, S. 213.

pH-Optimum für Gal-1-PUT:

Beutler, E. and Baluda, M. C.:
Biochemical properties of human red cell gal-1-put
from normal and mutant subjects.

Kurahashi, K., Anderson, E. P.:
Biochem. biophysica Acta
Amsterdam, 29 (1958), 498.

Kurahashi, K. Sigimura, A.:
J. biol. Chemistry 235 (1960), 940.

Rutter, W. J., Hansen, R. G.:
J. biol. Chemistry 202 (1953), 323.

Konzentrationsoptimum der Galaktokinase für Gal:

Heinrich, R. M.:
J. biol. Chemistry 239 (1964), 50.

Trucco, R. E., Caputto, R., Leloir, L. F., Mittelmann, N.:
Arch. Biochemistry 18 (1948), 137.

Osmotische Diurese bei Gal-Fütterung von Ratten:

Heggeness, F. W.:
J. Nutrit. 69 (1959), 142.

Gestörte tubuläre Nierenfunktion für Aminosäuren und Peptide:

Rosenberg, L. E., Weinberg, A. N., Segal, S.:
Biochem. Biophysica Acta
Amsterdam, 48 (1961), 500

Mineralien:

Handler, P.:
J. Nutrit. 33 (1947), 221.

Heggeness, F. W.:
J. Nutrit. 69 (1959), 142.

Craig, J. M., Maddock, C. E.:
A. M. A. Arch. Pathol. 55 (1953), 118.

L e b e n s l a u f

Am 18. 1. 1942 wurde ich als Sohn des Rektors Walter Garbe und seiner Frau Maria Magdalena, geb. Walter, in Lauban/Schlesien geboren.

Nach der Flucht im Februar 1945 nach Regen im Bayerischen Wald übersiedelten wir im August 1946 nach München. Hier besuchte ich von 1948 - 1953 die Volksschule, ab 1953 das Alte Realgymnasium, wo ich im Juni 1962 die Reifeprüfung ablegte.

Nach einem Jahr als Regierungsinspektor-Anwärter am Landratsamt Starnberg begann ich im Wintersemester 1963/64 das Studium der Medizin an der Universität in München, an der ich im Juni 1969 das Staatsexamen bestand.

Meine Medizinalassistentenzeit verbrachte ich ab Oktober 1969 am Städtischen Krankenhaus München-Schwabing und setzte sie ab Januar 1970 am Rotkreuzkrankenhaus I in München fort.